合成タンパク質の精製

C 末端、或いは N 末端に *strep*-tag®(IBA GmbH)または FLAG®-tag(Sigma-Aldrich Corp.)を導入することで、簡便に目的タンパク質を回収することが可能です。本項目ではこれらのプロトコールを示します。

1. cDNA へのタグ配列の導入と pTD1 へのクローニング

① プライマーの設計

下記いずれかのプライマーセットを合成してください。

● ***strep*-tag®を N 末端に導入する場合**

strep-tag®配列

N 末端プライマー： 5'-ATGTGGAGCCATCCGCAGTTTGAAAAGNNNNNNNNNNNNNNN･･･-3'

開始コドン

C 末端プライマー： 5'-GGGGTACC TTANNNNNNNNNN･･･-3'

*Kpn*I など stop

● **FLAG®-tag を N 末端に導入する場合**

FLAG®-tag 配列

N 末端プライマー： 5'-ATGGACTACAAGGATGACGATGACAAGNNNNNNNNNNNNNNN･･･-3'

開始コドン

C 末端プライマー： 5'-GGGGTACC TTANNNNNNNNNN･･･-3'

*Kpn*I など stop

● ***strep*-tag®を C 末端に導入する場合**

N 末端プライマー： 5'-ATGNNNNNNNNNNNNNNN･･･-3'

開始コドン

strep-tag®配列

C 末端プライマー： 5'-GGGGTACC TTACTTTTCAAACTGCGGATGGCTCCANNNNNNNNNN･･･-3'

*Kpn*I など stop

● **FLAG®-tag を C 末端に導入する場合**

N 末端プライマー： 5'-ATGNNNNNNNNNNNNNNN･･･-3'

開始コドン

FLAG®-tag 配列

C 末端プライマー： 5'-GGGGTACC TTACTTGTCATCGTCATCCTTGTAGTCNNNNNNNNNN･･･-3'

*Kpn*I など stop

---

② PCR による鋳型 DNA の作成

発現ベクターの構築のプロトコルに従って、目的遺伝子を増幅し、pTD1 ベクターに挿入します（鋳型 DNA 作製のプロトコールと同様に行ってください）。

2. mRNA の合成と精製

mRNA の合成は市販の RNA 大量合成キットを使用し、100μL スケールで転写反応を行うことを推奨します。合成した mRNA は Transdirect *insect cell* 取扱い説明書 9-10 ページのプロトコールに従って精製してください。100μL スケールで転写反応を行った場合、500μg 程度の mRNA が取得できます。

3. タンパク質合成

Transdirect *insect cell* を用いて 1 mL スケールで翻訳反応を行います。

mRNA	320μg
4 mM Methionine	20μL
Reaction Buffer	300μL
Insect Cell Extract	500μL
H_2O	to 1000μL

- 25℃、4～5 時間
- 翻訳反応終了後、遠心分離を行います（15,000 rpm、15 分間）

3. アフィニティ精製

mRNA 精製に使用した Nick™ columns（GE Helthcare）を洗浄した空きカラムを用いてアフィニティカラムを作製しています。カラムの作製はある程度の時間を要するため、タンパク質合成を行う前に行うことを推奨します。

● *strep*-tag®の場合

- *Strep*-Tactin® Superflow（QIAGEN 社 30001 または 30003）のオープンカラムを作製します
  50%のスラリーとして供給されますので、カラム 1 本あたり 1 mL のスラリーを使用します。mRNA 精製に使用した Nick™ columns を洗浄した空きカラムに上記スラリーを充填します。フィルターをカラム上端に設置します。以上の操作で bed volume 0.5 mL のオープンカラム作製が完了です。
- 50 mM Tris-HCl, pH8.0, 300 mM NaCl（Buffer A）でカラムを平衡化します（5 mL）
- カラムに翻訳反応液の遠心上清をアプライします
- 0.5 mL の Buffer A でカラムを洗浄します。この操作を 5 回繰り返します
- 2.5 mM desthiobiotin（SIGMA 社 D1411-1G）を含む Buffer A を 1.5 mL 添加し溶出します
- 溶出液をスピンタイプの限外ろ過で濃縮します（20-50μL 程度）。

溶出液に desthiobiotin を用いた場合、カラムの再生が可能です。再生法については、*Strep*-Tactin® Superflow 添付の取扱い説明書を参照してください。5-10 回程度であれば、極端な収率の低下は認められておりません。

● FLAG®-tag の場合

- 翻訳反応液を 50 mM Tris-HCl, pH8.0, 150 mM NaCl（Buffer B）で平衡化した PD-10（GE ヘルスケアバイオサイエンス社 17-0851-01）にアプライし脱塩します。
- Anti-FLAG® M2 Agarose from mouse（SIGMA 社 A2220）の上記と同様の操作でオープンカラムを作製します。
  50%のスラリーとして供給されますので、カラム 1 本あたり 1 mL のスラリーを使用します。
- Buffer B でカラムを平衡化します（5 mL）。
- カラムに PD-10 の溶出液をアプライします。
- 1.0 mL の Buffer B でカラムを洗浄します。この操作を 5 回繰り返します。
- 100μg/ mL FLAG Peptide（SIGMA 社 F3290）を含む Buffer B を 2.5 mL 添加し溶出します。
- 溶出液をスピンタイプの限外ろ過で濃縮します（20-50μL 程度）。

カラムの再生が可能です。再生法については、Anti-FLAG® M2 Agarose from mouse 添付の取扱い説明書を参照してください。5-10 回程度であれば、極端な収率の低下は認められておりません。

実施例については、Transdirect *insect cell* アプリケーションデータ②を参照してください。
典型的な例として、1 mL の反応液あたり 10-20 μg のタンパク質が取得できます。しかしながら、どちらのタグを用いるか、また N 末端 C 末端どちらにタグを導入するかは、タンパク質の種類によって大きく異なります。次項にタンパク質精製におけるトラブルシューティングおよびその対処法を記します。

4. トラブルシューティング

○ 目的タンパク質の収量が少ない。

- まずは、目的タンパク質が可溶性画分にあることを確認してください。可溶性画分にある場合、カラムに吸着していないことが考えられます。
- 使用するタグの種類、タグの導入位置を検討してください。
- 目的遺伝子とタグ配列の間にスペーサー配列を挿入してください（次項で詳述します）。
- 排除分子量の小さな限外ろ過膜を用いて濃縮してください。
- カラムを新しいものに変更してください。

○ 目的タンパク質の精製度が低い

- 抽出液由来タンパク質のカラムへの非特異的吸着、または目的タンパク質への吸着が考えられます。Buffer 系を検討してください。*Strep*-Tactin® Superflow では、1% Triton X-100、1% Tween、0.3% CHAPS、2% Igepal CA-630、1 M NaCl などが使用できます（詳細は取扱い説明書に記載されています）。Anti-FLAG® M2 Agarose from mouse では、5% Triton X-100、5% Tween20、0.1% CHAPS、0.1% Igepal CA-630、1 M NaCl などが使用できます（詳細は各製品の取扱説明書に記載されています）。
- transmembrane domain やシグナルペプチドなどの疎水性領域を含むタンパク質を合成、精製した場合、約 50kDa、70kDa 付近の抽出液由来のタンパク質がコンタミするケースが多く観察されています（50kDa のタンパク質は β-チューブリンであることを確認しています）。このような場合は疎水性領域を欠損させたコンストラクトを構築することを推奨します（例：シグナルペプチドを有するタンパク質を成熟型タンパク質として発現）。

5. スペーサー配列を含むタグ発現用ベクターの構築

目的遺伝子とタグ配列の間にスペーサー配列を挿入することで、回収率が飛躍的に改善される場合があります。ここでは、C 末端タグの前に 8 つのグリシン残基からなるスペーサー配列が挿入される発現ベクターの構築法を記します。

○ *strep*-tag®の場合

以下のプライマーを合成します。

G8-strep-F：
5'-GGGAATTCGGTACCGGATCCGGTGGAGGTGGAGGTGGAGGTGGATGGAGCCATCCGCAGTTTGAAAAGTAATCTAGAGC-3'

G8-strep-R：
5'-GCTCTAGATTACTTTTCAAACTGCGGATGGCTCCATCCACCTCCACCTCCACCTCCACCGGATCCGGTACCGAATTCCC-3'

- 両者のプライマーを混合しアニールします
- *Eco*RI および *Xba*I で消化します
- これを pTD1 の *Eco*RI-*Xba*I サイトに挿入します

○ FLAG®-tag の場合

以下のプライマーを合成します。

G8-FLAG-F:
5'-GGGAATTCGGTACCGGATCCGGTGGAGGTGGAGGTGGAGGTGGAGACTACAAGGATGACGATGACAAGTAATCTAGAGC-3'

G8-FLAG-R:
5'-GCTCTAGATTACTTGTCATCGTCATCCTTGTAGTCTCCACCTCCACCTCCACCTCCACCGGATCCGGTACCGAATTCCC-3'

・ 上記と同様の操作で pTD1 の *Eco*RI-*Xba*I サイトに挿入します。

構築したベクターの塩基配列を以下に記します。

○ pTD1-G8-strep

5'・・・TAATACGACTCACTATAGGAGTAGTATTTTTATTCTTTCGTAAAAAAATTAGAAAAATAAAATATAAA

T7 Promoter　5' Polyhedrin Leader Sequence

GATATCGAATTCGGTACCGGATCCGGTGGAGGTGGAGGTGGAGGTGGATGGAGCCATCCGCAGTTTGAAAAG

*Eco*RV　*Eco*RI　*Kpn*I　*Bam*HI　Gly×8 spacer　strep

TAATCTAGA …

stop　*Xba*I

○ pTD1-G8-FLAG

5'・・・TAATACGACTCACTATAGGAGTAGTATTTTTATTCTTTCGTAAAAAAATTAGAAAAATAAAATATAAA

T7 Promoter　5' Polyhedrin Leader Sequence

GATATCGAATTCGGTACCGGATCCGGTGGAGGTGGAGGTGGAGGTGGAGACTACAAGGATGACGATGACAAG

*Eco*RV　*Eco*RI　*Kpn*I　*Bam*HI　Gly×8 spacer　FLAG

TAATCTAGA …

stop　*Xba*I

本ベクターへの目的遺伝子のクローニングにおいて、N 末端側プライマーは開始コドン以下の配列を使用してください。C 末端側のプライマーには、ストップコドンを含めないでください(vector に既に組み込まれております)。また、C 末端プライマーには *Eco*RI、*Kpn*I、*Bam*HI サイトに挿入できる制限酵素サイトを導入してください。開始コドンは、*Eco*RV の切断サイトに挿入することを推奨します。

<ご注意>
本プロトコルは、他社製試薬キットの使用に関し、いかなる使用許諾を示唆するものではありません。
それぞれの製品の取扱説明書等に従い、適切なご使用をお願い致します。